

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-328992

(43)公開日 平成5年(1993)12月14日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	Z N A C	8214-4B		
21/06		8214-4B		
// C 1 2 N 15/16				
15/62				
	8931-4B		C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数1(全 25 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-223520	(71)出願人	000001904 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
(22)出願日	平成4年(1992)7月31日	(72)発明者	▲薮▼田 雅之 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716番地1 サントリー株式会社医薬セン ター内
(31)優先権主張番号	特願平3-230769	(72)発明者	鈴木 雄司 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716番地1 サントリー株式会社医薬セン ター内
(32)優先日	平3(1991)8月19日	(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外4名)
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ペプチドの製造方法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 生理活性ペプチド又はその前駆体を、酸性側に等電点を有する融合蛋白質を経由して製造する方法の提供。

【構成】 A) 融合蛋白A-L-B (Bは目的ペプチド、Aは保護ペプチド、Lはリンカーペプチド) をコードする遺伝子を発現することができるプラスミドにより形質転換された宿主細胞を培養し、
B) 該形質転換体の培養菌体を破碎して封入体の不溶性画分を得、
C) 該不溶性画分を可溶化剤で処理することにより、該封入体中の融合蛋白を可溶化し、そして
D) 該可溶化された融合蛋白の前記リンカーアミノ酸残基のC-末端と前記目的ペプチドのN-末端の間のペプチド結合を酵素又は化学物質により切断して該目的ペプチドを他のペプチドから切り離すことを特徴とする製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ペプチド（目的ペプチド）の製造方法であって、

A) 次の式で表される融合蛋白：

A-L-B

（式中、Bは目的ペプチドであり、Aは90～200個のアミノ酸残基からなる保護ペプチドであり、そしてLは該保護ペプチドのC-末端と該目的ペプチドのN-末端との間に位置するリンカーペプチドであり、かつ該融合蛋白を酵素または化学物質により処理した場合に前記目的ペプチドが切り離されるように選択されており、そしてA-L-Bの融合蛋白全体の等電点が4.9～6.9の範囲にあるように該保護ペプチド及びリンカーペプチドが選択されている）をコードする遺伝子を発現することができるプラスミドにより形質転換された宿主細胞を培養し、

B) 該形質転換体の培養菌体を破碎して封入体の不溶性画分を得、

C) 該不溶性画分を可溶化剤で処理することにより、該封入体中の融合蛋白を可溶化し、そして

D) 該可溶化された融合蛋白の前記リンカーアミノ酸残基のC-末端と前記目的ペプチドのN-末端の間のペプチド結合を酵素又は化学物質により切断して該目的ペプチドを他のペプチドから切り離すことを特徴とする製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は生理活性ペプチド又はその前駆体（本発明において目的ペプチドと称する場合がある）を、酸性側に等電点を有する融合蛋白質を経由して製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 これまで組み換えDNA技術を用いて、真核生物由来の生理活性ペプチド又は蛋白質を大腸菌等の微生物で生産させようとする多くの試みがなされている。この場合、比較的分子量の小さいショートペプチドを大腸菌などを用いて直接発現系で生産を行うと、ショートペプチドは菌体内で速やかに分解を受けてしまう。

【0003】 この分解を押さえるために、一般的に目的とするペプチドを他の蛋白質あるいはポリペプチド（以下、保護ペプチドと言う）との融合蛋白として生産させた後、化学的あるいは酵素処理を行い、融合蛋白より目的とするペプチドを特異的に切り出し、その後、分離精製を行う方法が用いられている。

【0004】 融合蛋白から目的ペプチドを切り出す方法として、目的ペプチドがその分子中にメチオニン残基を含まない場合には保護ペプチドと目的ペプチドの間にリンカーペプチドのC-末端アミノ酸としてメチオニン残基を導入した融合蛋白を生産した後、臭化シアン（CNBr）処理によりメチオニン残基を開裂させて、目的ペ

プチドを切り出す方法（Science 198, 1059, (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 106, (1978)）が知られている。

【0005】 また、目的ペプチド分子内にアルギニン残基やリジン残基を含まない場合には、リンカーペプチドのC-末端アミノ酸としてアルギニン残基やリジン残基を保護ペプチドと目的ペプチドの間に導入した融合蛋白を生産した後、アルギニン残基やリジン残基のC-末端を特異的に切断するトリプシン処理で切り出す方法（Nature. 285, 456, (1980)）やリジン残基のC-末端を特異的に切り出すリシルエンドペプチダーゼ（アクロモバクタープロテアーゼーI）処理で切り出す方法も場合により目的ペプチドの切り出しに用いることができる。

【0006】 融合蛋白を生産させる場合の保護ペプチドには生産に用いる宿主微生物由来の蛋白質の断片がよく用いられる。この場合、宿主微生物細胞内で高発現されている蛋白質のN-末端（アミノ末端側）からの適当な大きさ（長さ）を持つポリペプチドが用いられているが、そのポリペプチドの長さが融合蛋白の生産性に大きく影響を与えることが知られている。

【0007】 例えば、該保護ペプチド領域を小さくして（短くして）融合蛋白に対する目的ペプチドの割合を大きくして生産性を向上させることが考えられるが、必ずしも該保護ペプチド領域を縮小しても目的ペプチドの生産性が向上するとは限らない。例えば、インスリンを融合蛋白の一部として大腸菌で生産させた場合、大腸菌β-ガラクトシダーゼを保護ペプチドとして用い、β-ガラクトシダーゼ領域を縮小させるとインスリンの生産性は一旦上昇するが、さらに縮小させるとインスリンの生産性は低下することが知られている（Gene, 29, 251, 1984）。

【0008】 このように融合蛋白の一部としてある目的のペプチドを生産させる場合、保護ペプチドがどれくらい大ききであればよいかという定説はなく保護ペプチドの大きさが融合蛋白の菌体内での安定性に大きく関わっている。一般的には安定な融合蛋白は宿主細胞内で不溶性の封入体を形成する。言い換えれば融合蛋白を宿主細胞で高生産させるには安定な封入体を形成させればよいことになる。

【0009】 しかし、場合によっては細胞あたりの封入体の発現量を増加させると封入体が細胞にダメージを与えることにより、細胞の増殖阻害を引き起こし培養容量当たりの封入体の生産性が下がることが考えられる。菌体内での封入体の形成のメカニズムについてはキャサリンの論文（Biotechnology, 7, 1141 (1989)）に詳述されているが、封入体形成には多くの要因が関与し、現在のところまだ定説はなく、工業スケールで融合蛋白を安定な封入体として菌体内で発現させ高生産を行う方法についても確固たる方法は確立されておらず、この方法の確立が待たれている。

【0010】 ヒトカルシトニンを融合蛋白として大腸菌

を用いて製造する方法は数多く報告されている。例えば、ベネット等はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ蛋白とヒトカルシトニン前駆体(hCT-Gly)の融合蛋白を大腸菌で発現し、ヒトカルシトニン前駆体を製造する方法を報告している(特開昭60-501391)。しかし、この方法では融合蛋白44mgからわずかに1.1-2.0mgのヒトカルシトニン前駆体しか得られず効率は低い。

【0011】一方、本発明者等はヒトカルシトニン前駆体(hCT-Gly-Lys-Lys-Arg)との融合蛋白を大腸菌体内で封入体として極めて効率的に生産させる方法について報告した(特開昭64-10999)。さらに本発明者等により、このようにして大腸菌体内で生産した封入体の融合蛋白を尿素を用いて可溶化した後、V8プロテアーゼでヒトカルシトニン前駆体(hCT-Gly-Lys-Lys-Arg)を融合蛋白より切り出し、カルボキシペプチダーゼBを用いてヒトカルシトニン前駆体(hCT-Gly-Lys-Lys-Arg)のC-末端部のLys-Lys-Argを除き、hCT-Glyを得、さらにアフリカツメガエル由来のC-末端アミド化酵素を用い、C-末端がアミド化されたヒトカルシトニンが効率よく得られることが示されヒトカルシトニンの製造方法が開示されている(特開平2-190193)。しかしながら、さらに効率的なペプチドの製造方法が望まれている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は生理活性ペプチド又はその前駆体を効率的に大量生産できる方法を提供しようとするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記の問題点の解決方法を検討した結果、融合蛋白の生産性を上げるためには、融合蛋白の等電点がpI4.9からpI6.9までの領域に入ることが融合蛋白の安定かつ高生産につながるという事実を初めて実験的に明らかにし、リンカーペプチド内のアミノ酸を電荷を持ったアミノ酸(塩基性アミノ酸残基あるいは酸性アミノ酸残基)の数を調整して融合蛋白自身の等電点をpI4.9からpI6.9に調整することにより前記の問題点が解決されるという全く新しい知見を得、この知見に基づいてこの発明を完成した。

【0014】従って、本発明は、生理活性ペプチド又はその前駆体(目的ペプチド)の製造方法であって

A) 次の式で表される融合蛋白:

A-L-B

(式中、Bは目的ペプチドであり、Aは90~200個のアミノ酸残基からなる保護ペプチドであり、そしてLは該保護ペプチドのC-末端と該目的ペプチドのN-末端との間に位置するリンカーペプチドであり、かつ該融合蛋白を酵素または化学物質により処理した場合に前記

目的ペプチドが切り離されるように選択されており、A-L-Bの融合蛋白の全体の等電点が4.9~6.9の範囲にあるように該保護ペプチド及びリンカーペプチドが選択されている)をコードする遺伝子を発現することができるプラスミドにより形質転換された宿主細胞を培養し、

B) 該大腸菌形質転換体の培養菌体を破碎して封入体の不溶性画分を得、

10 C) 不溶性画分を可溶化剤で処理することにより、封入体中の融合蛋白を可溶化し、そして

D) 該可溶化された融合蛋白の前記リンカーアミノ酸残基のC-末端と前記目的ペプチドのN-末端の間のペプチド結合を酵素又は化学物質により切断して該目的ペプチドを他のペプチドから切り離すことを特徴とする方法を提供するものである。

【0015】

【具体的な説明】本発明の方法は生理活性ペプチド(目的ペプチド)の融合蛋白、特にその封入体を経由して製造するために適用することができ、このようなペプチドとして本発明において具体的に説明するヒトカルシトニンのほかにヒト以外のカルシトニン及びその前駆体、ANP, BNP, CNP等のナトリウム利尿ペプチド(NP)、細胞増殖因子、副甲状腺ホルモン(PTH)等をあげることができるが、これらに限定されるものではない。

【0016】本発明における保護ペプチドは、宿主が本来有するペプチドであることが好ましい。例えば宿主として大腸菌を用いる場合には大腸菌β-ガラクトシダーゼ又はその部分を用いるのが好ましい。大腸菌β-ガラクトシダーゼの部分を用いる場合にはそのN-末端部分を用いるのが好ましく、例えばN-末端側の90~210個のアミノ酸から成るものが好ましい。特に好ましい保護ペプチドは大腸菌β-ガラクトシダーゼのN-末端の1位から97位までのアミノ酸から成るペプチドである。さらに好ましいのは、この97個のアミノ酸残基から成るペプチドにおいてシステイン残基がセリン残基に置き換えられているものであり、最も好ましくは、前記97個のアミノ酸残基から成るペプチドにおいてシステイン残基がセリン残基に置き換えられておりさらに4個のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に置き換えられているものである。

【0017】本発明の方法は、目的ペプチドを、4.9~6.9の間の等電点を有する融合蛋白の形で生成せしめることを特徴としている。この場合、融合蛋白の等電点は、そのアミノ酸配列から次の様にして算出することができる。なお、等電点の計算方法はTrends in Analytical Chemistry, Vol 5, No 4, 82~83頁(1986)に記載されている方法によればよく、例えばこの方法に基づいて作成されたDNASIS(日立製造所)の等電点予測プログラムを用いることができる。

【0018】融合蛋白の等電点を上記の範囲に調整するには、目的ペプチドのアミノ酸を変更することはできないから、保護ペプチド及び／又はリンカーペプチドアミノ酸残基の調整により行う。この場合、保護ペプチド及び／又はリンカーペプチドとして、目的ペプチドとの融合蛋白として前記の等電点を与えるような天然ペプチド又はその部分を選択することができる。他の方法としては、天然ペプチド又はその部分のアミノ酸残基の置換、除去又は導入により融合蛋白の等電点を調整することができる。

【0019】この調整においては、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸残基もしくはグルタミン酸残基の導入もしくは除去、塩基性アミノ酸であるアルギニン残基もしくはリジン残基の導入もしくは除去、又はこれらのアミノ酸による他のアミノ酸の置換、あるいはこれらのアミノ酸操作の組合せを用いることができる。前記のごとく、融合蛋白の等電点は保護ペプチド及びリンカーペプチドのいずれか一方、又はその両者により行うことができる。

【0020】この様なペプチドとして、pBR322由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の403位～495位の塩基配列によりコードされ得るペプチド又はその部分を用いることができる。図1及び配列番号：1に示すごとく、この遺伝子領域には、33個のアミノ酸残基中に10個のアルギニン残基をコードすることが可能であり、この領域中の種々部分を用いることにより、異なる数のアルギニン残基を含有する種々のリンカーペプチドを得ることができる。この場合、1個以上、好ましくは3個以上、特に好ましくは3～8個のアルギニン残基を含む部分を用いるのが好ましい。

【0021】融合蛋白から目的ペプチドを切り出すためには、リンカーペプチドのC-末端には酵素的又は化学的に開裂され得るアミノ酸残基が存在する必要がある。これらのアミノ酸残基として、例えば、トリプシンによる切断のためのアルギニン残基又はリジン残基、リシルエンドペプチダーゼによる切断のためのリジン残基、V8プロテアーゼによる切断のためのグルタミン残基、臭化シアンで切断するためのメチオニン残基等が用いられる。

【0022】次に、融合蛋白質を発現するプラスミドの作製を、目的ペプチドがヒトカルシトニン前駆体である場合を例にとって説明する。ヒトカルシトニンのアミノ酸配列とそのC-末端に追加されたグリシン残基とから成るヒトカルシトニン前駆体を種々のリンカーを含む融合蛋白として発現させるための発現プラスミドを作製するための出発プラスミドとしてプラスミドpG97S4DhCT[G]を用いる。

【0023】このプラスミドにおいては、図2に示すごとく、大腸菌β-ガラクトシダーゼのN-末端の97個のアミノ酸からなりこの中のシステイン残基がセリン残

基に置き換えられておりさらに4個のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に置き換えられている保護ペプチドをコードする構造遺伝子(βgal97S4D)とヒトカルシトニン前駆体の構造遺伝子とがEcoRI及びXhoI認識部位を介して連結されており、この融合蛋白をコードする構造遺伝子はlacプロモーターの制御下にある。さらにこのプラスミドはテトラサイクリン耐性遺伝子マーカーを含有する。

【0024】このプラスミドは特開平2-190193に記載されているプラスミドpG97SHPCTLE

[G]に由来するものであり、前記プラスミドpG97S4DhCT[G]を含有する大腸菌W3110株は、Eschevichia coli SBM323として、工業技術院微生物工業技術研究所に1991年8月8日に、ブダペスト条約に基き寄託されており、受託番号微工研条寄第3503号(FERM BP-3503)が付与されている。

【0025】プラスミドpG97S4DhCT[G]によりコードされている融合蛋白は、β-ガラクトシダーゼのN-末端の97個のアミノ酸から成りこの中でシステイン残基がセリン残基に置き換えられておりさらに4個のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に置き換えられている保護ペプチドと前記ヒトカルシトニン前駆体とから成り、その発現は非常に低く、その等電点は4.43であった。従って、広範囲の等電点にわたる種々の融合蛋白を発現させるため、前記β-ガラクトシダーゼ遺伝子とヒトカルシトニン前駆体遺伝子との間に、EcoRI-XhoI部位を用いて、種々の等電点リンカーペプチドをコードするDNAを挿入する。

【0026】この様なリンカーペプチドとしては、プラスミドpBR322のヌクレオチド位置86-1273のテトラサイクリン耐性遺伝子由来の遺伝子によりコードされ得る33個のアミノ酸からなるペプチド、又はその部分を用いるのが便利である。このペプチド領域には10個のアルギニン残基が分布しており、この中の適当な部分をリンカーペプチドとして用いることにより、種々の等電点を有する融合蛋白を得ることができる。

【0027】このペプチド領域から得られるリンカーペプチド及びそれをコードするヌクレオチド配列を図1に示す。これらのリンカーペプチドをコードする遺伝子は、プラスミドpBR322から適当な制限酵素で切り出すことにより、又は常法に従って化学合成することにより得られる。これらのリンカーペプチドR₁, R₃, R₄, R₅, R₆, R₈及びR₁₀は、それぞれ、1, 3, 4, 5, 6, 8、及び10個のアルギニン残基を含んでいる。これらのリンカーペプチドをコードする遺伝子が、前記プラスミドpG97S4DhCT[G]中のEcoRI-XhoI部位に挿入された発現プラスミドをそれぞれ、pG97S4DhCT[G]R1, pG97S4DhCT[G]R3, pG97S4DhCT[G]R4, pG97S4DhCT[G]R5, pG97S4

DhCT [G] R6, pG97S4DhCT [G] R8、及びpG97S4DhCT [G] R10と称する。

【0028】また、前記出発プラスミド及びこれらのプラスミドにより形質転換して得られる大腸菌W3110株を、それぞれW3110/pG97S4DhCT [G], W3110/pG97S4DhCT [G] R1, W3110/pG97S4DhCT [G] R3, W3110/pG97S4DhCT [G] R4, W3110/pG97S4DhCT [G] R5, W3110/pG97S4DhCT [G] R6, W3110/pG97S4DhCT [G] R8, W3110/pG97S4DhCT [G] R10と称する。

【0029】これらの菌株が生産する融合蛋白の等電点を計算すると

W3110/pG97S4DhCT [G] (リンカー領域のアルギン残基数=0) ; 等電点=4.43, W3110/pG97S4DhCT [G] R1 (リンカー領域のアルギン残基数=1) ; 等電点=4.70, W3110/pG97S4DhCT [G] R3 (リンカー領域のアルギン残基数=3) ; 等電点=4.90, W3110/pG97S4DhCT [G] R4 (リンカー領域のアルギン残基数=4) ; 等電点=5.80, W3110/pG97S4DhCT [G] R5 (リンカー領域のアルギン残基数=5) ; 等電点=5.91, W3110/pG97S4DhCT [G] R6 (リンカー領域のアルギン残基数=6) ; 等電点=6.01, W3110/pG97S4DhCT [G] R8 (リンカー領域のアルギン残基数=8) ; 等電点=6.83、及びW3110/pG97S4DhCT [G] R10 (リンカー領域のアルギン残基数=10) ; 等電点=7.85となる。

【0030】上記に示した等電点4.43から7.85までの融合蛋白を生産する大腸菌株を培養し、細胞数あたりの融合蛋白の生産量をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べてみたところ、W3110/pG97S4DhCT [G] ; 等電点=4.43の菌株及びW3110/pG97S4DhCT [G] R1 ; 等電点=4.70の菌株はわずかの融合蛋白を生産し、そのほかの菌株は菌体内に大量の融合蛋白の封入体を生産していることが明らかになった。したがって、融合蛋白の等電点が4.5~4.7付近以下になると融合蛋白の生産性及びその封入体の生産量が悪くなることがこの結果より示されたことになる。

【0031】さらにW3110/pG97S4DhCT [G] R10 ; 等電点=7.85の菌株では細胞数あたりの融合蛋白の生産性は他の菌株と同程度であるが、培養時における最終菌体濃度が他の菌株の半分しかならないことが明らかになった。これは融合蛋白の等電点が弱アルカリ性の7.85であることから、細胞あたりの融合蛋白生成能は上がったが、急速に封入体を形成した為かあるいは融合蛋白の等電点が弱アルカリ性である為か

の理由により細胞増殖阻害を引き起こし、結果として最終細胞濃度が増加しなかったと考えられる。

【0032】以上の結果より、融合蛋白を封入蛋白として大腸菌体内で安定にかつ高生産させるには、融合蛋白の等電点が4.9から6.9の間の酸性領域に入ることが重要であることが本発明者等により初めて明らかにされた。次に、本発明者等はこのようなして大腸菌体内で生産されたヒトカルシトニン前駆体の融合蛋白の封入体から効率よくヒトカルシトニン前駆体 (hCT-Gly)

(X. laevis) 由来のアミド化酵素を用いてC-末端がアミド化されたヒトカルシトニンが効率よく製造できることを明らかにした。

【0033】本発明の他の例として、融合蛋白質を発現するプラスミドの作製を、目的ペプチドがヒトC-type natriuretic peptide-22 (C-タイプナトリウム利尿ペプチド: 以下ヒトCNP-22と略す) (配列番号: 10) である場合を例にとりて説明する。22個のアミノ酸よりなるヒトCNP-22を種々のリンカーを含む融合蛋白として発現させるための発現プラスミドを作製するための出発プラスミドとしてプラスミドpG97S4DhCNP-22を用いた。

【0034】このプラスミドは図10に示すごとく、大腸菌β-ガラクトシダーゼのN末端の97個のアミノ酸よりなり、この中のシステイン残基がセリン残基に置き換えられ、さらに4個のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基に置き換えられている保護ペプチドをコードする構造遺伝子 (β-gal97S4D) とヒトCNP-22の構造遺伝子とがEcoRIおよびXhoI制限酵素認識部位を介して連結され、この融合蛋白をコードする構造遺伝子はlacプロモーターの制御下にある。さらにこのプラスミドはテトラサイクリン耐性遺伝子マーカーを含む。このpG97S4DhCNP-22発現プラスミドを作製するにあたりヒトCNP-22遺伝子及び当該遺伝子を調製するのに使用したプラスミドpUCCNP1は特開平4-139199に開示されている。また保護ペプチドをコードするプラスミドとして用いたpG97S4DhCT [GRRR] は実質的に前述のpG97S4DhCT [G] と同じである。

【0035】プラスミドpG97S4DhCNP-22によりコードされている融合蛋白の等電点は4.56であり、先に示した融合蛋白の高発現のためには融合蛋白の等電点がpI=4.9-6.9の領域に入ることが望ましいという観点から考えると融合蛋白の高生産は期待できないと考えられる。そこで、等電点4.9-6.9にわたる種々の融合蛋白をデザインし融合蛋白を大腸菌体内で大量に発現させる目的で前記β-ガラクトシダーゼ遺伝子とヒトCNP遺伝子の間のEcoRI-XhoI領域に種々の塩基性アミノ酸をコードするリンカーペプチド遺伝子を挿入することを検討した。

【0036】このようなリンカーペプチドとしては塩基性アミノ酸をコードする遺伝子を人為的にデザインし化学的に合成する方法が可能である。図11に塩基性アミノ酸をコードするリンカーペプチド遺伝子のデザインと化学的に合成した遺伝子配列を示す。これらのリンカーペプチドR3-2〔配列番号13および14〕、R5-2〔配列番号15および16〕並びにR5-3〔配列番号17および18〕はそれぞれ3個、5個および5個のアルギニン残基を含んでいる。これらのリンカーペプチドをコードする遺伝子が前記pG97S4DhCNP-22中のEcoRI-XhoI領域部位に挿入された発現プラスミドをそれぞれpG97S4DhCNP-22R3-2、pG97S4DhCNP-22R5-2およびpG97S4DhCNP-22R5-3と称する。

【0037】また前記出発プラスミドおよびこれらのプラスミドにより形質転換して得られる大腸菌W3110株をそれぞれW3110/pG97S4DhCNP-22、W3110/pG97S4DhCNP-22R3-2、W3110/pG97S4DhCNP-22R5-2およびW3110/pG97S4DhCNP-22R5-3と称する。

【0038】これらの菌株が生産する融合蛋白の等電点を計算すると、W3110/pG97S4DhCNP-22（リンカー領域のアルギニン残基数=0）；等電点=4.56、W3110/pG97S4DhCNP-22R3-2（リンカー領域のアルギニン残基数=3）；等電点=4.95、W3110/pG97S4DhCNP-22R5-2（リンカー領域のアルギニン残基数=5）；等電点=6.22、W3110/pG97S4DhCNP-22R5-3（リンカー領域のアルギニン残基数=5）；等電点=5.59となる。

【0039】上に示した等電点4.56から6.22までの融合蛋白を生産する大腸菌株を培養し細胞あたりの融合蛋白の生産量をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べてみたところ、W3110/pG97S4DhCNP-22株（融合蛋白の等電点=4.56）の融合蛋白の生産量はさほど高くなかったが、融合蛋白の等電点をpI4.95-6.22まで上げた菌株ではW3110/pG97S4DhCNP-22株に比べて融合蛋白の発現量が高くなっていることが明らかになった。

【0040】特に、等電点が5.59のW3110/pG97S4DhCNP-22R5-2株および等電点が6.22のW3110/pG97S4DhCNP-22R5-3株ではW3110/pG97S4DhCNP-22株に比べ融合蛋白を高発現していることが明らかになった（図14参照）。このヒトCNP-22の場合においても、融合蛋白の等電点が4.9から6.9の範囲に入ることにより融合蛋白の生産性が良くなることが示された。さらに、本発明者等はこのようにして大腸菌体

内で生産された融合蛋白の封入体からヒトCNP-22がV8プロテアーゼを用いて効率良く切り出され、ヒトCNP-22が効率良く製造できることを明らかにし本発明の有用性を示した。

【0041】

【実施例】次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. 発現ベクターの作製方法

リンカーペプチド領域にアルギニン残基を1個から10個有する融合蛋白を発現する発現プラスミドを以下のようにして作製した。

【0042】(A) pG97S4DhCT〔G〕R10の作製

図1に示したR10領域のアミノ酸をコードする遺伝子を β -gal97S4D（ β -ガラクトシダーゼのN-末端の97個のアミノ酸から成りその中でシステイン残基がセリン残基に置き換えられておりそして4個のグルタミン酸残基がアスパラギン酸残基により置き換えられているペプチド）遺伝子とhCT〔G〕（C-末端に1個のグリシン残基を有するヒトカルシトニン前駆体）遺伝子との結合部にEcoRI及びXhoI切断部位を介して挿入するために以下の操作を行った。pG97S4DhCT〔G〕R10の作製方法を図2に示す。

【0043】まず、pBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子中のR10領域を単離するためにpBR322を制限酵素を用いて切断した。High緩衝液（10mM Tris/HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mMジチオスレイトール；以下DTT）300 μ l中で150 μ gのpBR322をBamHI及びEco47IIIそれぞれ200ユニットを用いて37℃, 60分間切断反応を行った。

【0044】反応後、反応液に30 μ lのdye溶液（0.25%プロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノール、40%ショ糖）を加え、1.5%寒天ゲル電気泳動（TAE緩衝液；40mM Tris-酢酸pH8.0, 2mMEDTA, 120V, 2時間）を行った。泳動後、0.5 μ g/mlのエチジウムブロマイド溶液中にゲルを浸し、染色を行い、目的とするBamHI-Eco47III（119bp）DNA断片のバンドをゲルから切り出した。

【0045】ゲルをTAE緩衝液を含む透析チューブに入れ、電気泳動（120V, 30分）を行い、119bp DNA断片をゲルから溶出させた。その後、透析チューブの溶液を回収し、常法に従い、フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、40 μ lのTE緩衝液（10mM Tris/HCl pH8.0, 1mMEDTA）にエタノール沈殿を溶かし、BamHI-Eco47III（119bp）DNA断片を精製した。このBamHI-Eco47III（119bp）DNA断片20 μ l溶液に2.5 μ lの10倍濃度Med緩衝液（100mM Tr

is/HCl pH7.5, 500mM NaCl, 100mM gCl_2 , 10mM DTT) 及び HaeIII 10ユニットを加え、37℃, 2時間反応を行った。反応後、2.5 μl の dye 溶液を加えた後、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (TBE緩衝液; 89mM Tris-ホウ酸緩衝液 pH8.0, 2mM EDTA)、120V, 90分) を行った。

【0046】泳動後ゲルをエチジウムブロミド溶液中で染色し、HaeIII-Eco47IIDNA断片 (89bp) のバンドをゲルから切り出した。このゲルを細かくし、200 μl のDNA溶出緩衝液 (0.5M酢酸アンモニウム、1mMEDTApH8.0) を加え、37℃で12時間放置した。その後、常法に従い、フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、5 μl のTE緩衝液 (10mM Tris/HCl pH8.0, 1mMEDTA) にエタノール沈殿を溶かし、HaeIII-Eco47IIDNA断片 (89bp) を精製した。

【0047】次に、pG97S4DhCT [G] プラスミド5 μg を50 μl のTE緩衝液 (330mM Tris/酢酸 pH7.9, 500mM NaCl, 100mM酢酸マグネシウム、5mM DTT, 660mM酢酸カリウム、0.01%牛血清アルブミン) で、30ユニットのEcoRIを用いて、37℃, 2時間反応を行った。さらにこの反応液に各25mMのdATP, dGTP, dCTP, dTTPからなるdNTPを1 μl と4ユニットT4DNAポリメラーゼを加え37℃, 5分間DNA末端の平滑反応を行い、その後、常法に従い、フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、10 μl のTE緩衝液に溶解した。

【0048】このEcoRI切断後、平滑反応を行なったpG97S4DhCT [G] 5 μl とHaeIII-Eco47IIDNA断片 (89bp) 5 μl を混合し、DNAライゲーションキット (宝酒造) を用いてライゲーション反応を16℃, 12時間行った。反応後、常法に従い大腸菌W3110に形質転換を行い、テトラサイクリン耐性形質転換株を得た。形質転換株のプラスミドの解析は、BspHI及びBglIIを用いて切断後、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、正しい方向に挿入されたものを選び、W3110/pG97S4DhCT [G] R10株を得た。

【0049】(B) pG97S4DhCT [G] R6の作製

図1に示したR6領域のアミノ酸をコードする遺伝子を $\beta\text{-ga197S4D}$ 遺伝子と hCT [G] 遺伝子との結合部にEcoRI及びXhoI切断部位を介して挿入するために以下の操作を行った。pG97S4DhCT [G] R6の作製を図2に示す。

【0050】まず、pBR322のテトラサイクリン耐性遺伝子中のR6領域を単離するためにpBR322を制限酵素を用いて切断した。High緩衝液 (10mM

Tris/HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM gCl_2 , 1mM DTT) 300 μl 中で150 μg の pBR322をBamHI及びEco47IIIそれぞれ200ユニットを用いて37℃, 60分間切断反応を行った。反応後、反応液に30 μl の dye 溶液 (0.25%プロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノール、40%ショ糖) を加え、1.5%寒天ゲル電気泳動 (TAE緩衝液; 40mM Tris-酢酸、2mMEDTA, 120V, 2時間) を行った。

10 【0051】泳動後、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイド溶液中にゲルを浸し、染色を行い、目的とするBamHI-Eco47III (119bp) DNA断片のバンドをゲルから切り出した。ゲルをTAE緩衝液を含む透析チューブに入れ、電気泳動 (120V, 30分) を行い、119bpDNA断片をゲルから溶出させた。その後、透析チューブの溶液を回収し、常法に従い、フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、40 μl のTE緩衝液 (10mM Tris/HCl pH8.0, 1mMEDTA) にエタノール沈殿を溶かし、BamHI-Eco47III (119bp) DNA断片を精製した。

20 【0052】このBamHI-Eco47III (119bp) DNA断片20 μl 溶液に2.5 μl の10倍濃度TAE緩衝液 (330mM Tris/酢酸 pH7.9, 500mM NaCl, 100mM酢酸マグネシウム、5mM DTT, 660mM酢酸カリウム、0.01%牛血清アルブミン) 及びBanI 10ユニットを加え、37℃, 2時間反応を行った。反応後、さらにこの反応液に25mM dNTPを1 μl と4ユニットのT4DNAポリメラーゼを加え37℃, 5分間DNA末端の平滑反応を行った。反応後、2.5 μl の dye 溶液を加えた後、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (TBE緩衝液; 89mM Tris-ホウ酸緩衝液 pH8.0, 2mMEDTA)、120V, 90分間行った。

30 【0053】泳動後ゲルをエチジウムブロミド溶液中で染色し、BanI-Eco47IIDNA断片 (56bp) のバンドをゲルから切り出した。このゲルを細かくし、200 μl のDNA溶出緩衝液 (0.5M酢酸アンモニウム、1mMEDTApH8.0) を加え、37℃で12時間放置した。その後、常法に従い、フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、5 μl のTE緩衝液 (10mM Tris/HCl pH8.0, 1mMEDTA) にエタノール沈殿を溶かし、BanI-Eco47IIDNA断片 (56bp) を精製した。

40 【0054】次に、pG97S4DhCT [G] プラスミド5 μg を50 μl のTAE緩衝液中で、30ユニットのEcoRIを用いて、37℃, 2時間反応を行った。さらにこの反応液に25mM dNTPを1 μl と4ユニットのT4DNAポリメラーゼを加え37℃, 5分間DNA末端の平滑反応を行い、その後、常法に従い、フェノール

ル処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、10 μ l のTE緩衝液に溶解した。

【0055】このEcoRI切断後、平滑反応を行なったpG97S4DhCT [G] 5 μ l とBanI-Eco47III DNA断片 (56bp) 5 μ l を混合し、DNAライゲーション (宝酒造) を用いてライゲーションキット反応を16℃, 12時間行なった。反応後、常法に従い大腸菌W3110に形質転換を行い、テトラサイクリン耐性形質転換株を得た。形質転換株のプラスミドの解析は、BspHI及びBgIIを用いて切断後、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、正しい方向に挿入されたものを選び、W3110/pG97S4DhCT [G] R6株を得た。

【0056】(C) pG97S4DhCT [G] R8の作製

図1に示したR8領域のアミノ酸をコードする遺伝子を β -gal97S4D遺伝子とhCT [G] 遺伝子との結合部にEcoRI及びXhoI切断部位を介して挿入するために以下の操作を行った。pG97S4DhCT [G] R8の作製を図3に示す。

【0057】High緩衝液50 μ l中にpG97S4DhCT [G] R10を10 μ gずつ入れたチューブ3本を用意し、各々のチューブにBbeIとBgII, BbeIとEcoRV及びBgIIとEcoRVをそれぞれ20ユニット入れ、37℃, 2時間反応後、1.5%寒天ゲル電気泳動を行い、BbeI-BgII (89bp), BbeI-EcoRV (353bp) 及びBgII-EcoRV (2.7Kb) のバンドをゲルから切り出し、電気泳動法によりゲルより溶出させた。その後、常法に従い、フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、5 μ l のTE緩衝液に溶解した。このようにして得られた3つのDNA断片を混ぜ、DNAライゲーションキットを用いて16℃, 12時間ライゲーション反応を行った。反応後、常法に従い大腸菌W3110に形質転換を行い、テトラサイクリン耐性形質転換株を得た。形質転換株のプラスミドの解析は、制限酵素を用いて切断後、ゲル電気泳動を行い、正しい方向に挿入されたものを選び、W3110/pG97S4DhCT [G] R8株を得た。

【0058】(D) pG97S4DhCT [G] R1, pG97S4DhCT [G] R3, pG97S4DhCT [G] R4及びpG97S4DhCT [G] R5の作製

図1に示したR1, R3, R4, R5領域のアミノ酸をコードする遺伝子を β -gal97S4D遺伝子とhCT [G] 遺伝子との結合部にEcoRI及びXhoI切断部位を介して挿入するために以下の操作を行った。

【0059】pG97S4DhCT [G] R1, pG97S4DhCT [G] R3, pG97S4DhCT [G] R4、pG97S4DhCT [G] R5の作製を

図4に示す。25 μ gのpG97S4DhCT [G] を50 μ lのHigh緩衝液に加え、30ユニットのXhoI及びEcoRIを加え37℃, 2時間、切断反応を行った。反応後、1%の寒天ゲル電気泳動を行い2.7KbのDNA断片をゲルより電気泳動法を用いて回収した。このDNA断片と図5に示した化学的に合成したオリゴヌクレオチドをそれぞれ100pmoleとライゲーション反応を行なった。反応後、常法に従い大腸菌W3110に形質転換を行い、テトラサイクリン耐性形質転換株を得た。

【0060】形質転換株のプラスミドの解析は、制限酵素を用いて切断後、ゲル電気泳動を行い確認を行い、W3110/pG97S4DhCT [G] R1株、W3110/pG97S4DhCT [G] R3株、W3110/pG97S4DhCT [G] R4株、及びW3110/pG97S4DhCT [G] R5株を得た。

【0061】以上、pG97S4DhCT [G] のEcoRI切断部位あるいはEcoRI-XhoI切断部位にテトラサイクリン耐性遺伝子の一部分を付加したプラスミドを7種類作製した。これらの挿入遺伝子は塩基性アミノ酸のアルギニンに対応するコドンで1個から最大10個含んでいるために、各々のキメラ蛋白質間で電荷が異なり等電点の異った融合蛋白質が生産される。生産される融合蛋白質の構造を図6に示す。

【0062】実施例2. hCT [G] 融合蛋白質の生産
作製した菌株の融合蛋白質の等電点と生産性の関係を検討するため、菌株を培養し、細胞数あたりの融合蛋白質の生産性をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて調べた。作製した菌株を500mlのSB培地 (0.5%グリセリン、2.4%酵母エキス、1.2%トリプトン、100mMリン酸水素カリウム緩衝液pH7.5、テトラサイクリン (10 μ g/ml)) で37℃, 12時間、フラスコで培養を行った。培養後、培養液の濁度 (OD600) を分光光度計で測定し、[OD600値×培養容量 (ml)] の値が5になるように培養液を採取し、12000rpm, 5分間遠心を行い、菌体を分離した。

【0063】この菌体沈殿物に1mlのSDSサンプルバッファー (63mM Tris-HCl pH6.8, 10%グリセリン、10%SDS, 5%2-メルカプトエタノール、12.5mg/Lブロムフェノールブルー) を加え、95℃, 5分間加熱し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料とした。上記試料の5 μ lを用いてSDS-16%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (TEFCO製) を18mA, 90分間の条件で行った。泳動後、ゲルを染色液 (10%酢酸、40%メタノール、2g/LクマジーブリリアントブルーR250) で染色し、各菌株の生産したhCT [G] 融合蛋白質の細胞あたりの生産性を比較した。電気泳動の結果を図7に示す。

【0064】図7から明らかな様にW3110/pG97S4DhCT [G] ; 等電点=4.43の菌株は非常

に極く僅かの融合蛋白の封入体しか生産できずW3110/pG97S4DhCT [G] R1; 等電点=4.70の菌株は若干の融合蛋白を生産し、そのほかの菌株は菌体内に大量の融合蛋白の封入体を生産していることが明らかになった。したがって、融合蛋白の等電点が4.5~4.7付近以下になると融合蛋白の生産性及びその封入体の生産量が悪くなることがこの結果より示されたことになる。

【0065】つぎに、W3110/pG97S4DhCT [G] R3, W3110/pG97S4DhCT [G] R4, W3110/pG97S4DhCT [G] R5, W3110/pG97S4DhCT [G] R6, W3110/pG97S4DhCT [G] R8, W3110/pG97S4DhCT [G] R10の菌株を用いて、20リッター培養槽での大量培養生産を行い大量培養の条件下における融合蛋白の生産性、及び融合蛋白からV8プロテアーゼを用いてhCT [G]を切り出す効率について検討した。

【0066】実施例3. 大量培養条件下における融合蛋白の生産性とV8プロテアーゼにおける融合蛋白からのhCT [G]の切り出し

大量培養条件下における融合蛋白の生産性とV8プロテアーゼによる種々のhCT [G]融合蛋白からのhCT [G]の切り出し効率を検討するため以下の実験を行った。

【0067】前述のSB培地を用いたフラスコ培養に於 *

* て封入体の形成が認められた高発現株の6株 (W3110/pG97S4DhCT [G] R3株、W3110/pG97S4DhCT [G] R4株、W3110/pG97S4DhCT [G] R5株、W3110/pG97S4DhCT [G] R6株、W3110/pG97S4DhCT [G] R8株、及びW3110/pG97S4DhCT [G] R10株) について20L培養槽を用いて培養を行った。

【0068】培地には酵母エキス4g/L、リン酸二カリウム4g/L、リン酸一カリウム4g/L、リン酸二ナトリウム2.7g/L、硫酸アンモニウム1.2g/L、塩化アンモニウム0.2g/L、L-メチオニン2.0g/L、MgSO₄・7H₂O2.0g/L、FeSO₄・7H₂O40mg/L、CaCl₂・2H₂O40mg/L、AlCl₃・6H₂O10mg/L、CoCl₂・6H₂O4mg/L、ZnSO₄・7H₂O2mg/L、Na₂MoO₄・2H₂O2mg/L、Na₂MoO₄・2H₂O2mg/L、CuCl₂・2H₂O1.0mg/L、H₃BO₃0.5mg/L、及びMnSO₄・nH₂O10mg/Lを含み炭素源として培養初期はグルコース(2%)を用い、グルコース消費後はグリセリン(8%)を炭素源とした。pHを7.0にコントロールしながら24時間培養を行った。最終到達菌体濃度の結果を表1に示す。

【0069】

【表1】

菌 株	最終菌体濃度 (OD660) (a)	菌体当たりの封入 体量 (絶対値) (b)	総封入体量 (相対値) (a)×(b)
W3110/pG97S4DhCT [G] R10	53	116	6148
W3110/pG97S4DhCT [G] R8	120	113	13560
W3110/pG97S4DhCT [G] R6	110	106	11660
W3110/pG97S4DhCT [G] R5	105	100	10500
W3110/pG97S4DhCT [G] R4	94	100	9400
W3110/pG97S4DhCT [G] R3	106	96	10176

【0070】表1から明らかなようにW3110/pG97S4DhCT [G] R10株は他の菌株に比べて著しく増殖が悪く、他の菌株の約半分の最終到達菌体濃度しかないことが明らかになった。W3110/pG97S4DhCT [G] R10株の生産する融合蛋白の等電点が弱アルカリ性の7.85であり、細胞あたりの融合蛋白生成能は上がったが、急速に封入体を形成した為かあるいは融合蛋白の等電点が弱アルカリである為に細胞増殖阻害を引き起こした為かの理由により、結果的に細胞到達濃度が低かったのではないかと考えられる。

※ 【0071】従って、これらの検討結果より、大腸菌体内で融合蛋白を封入体として安定にかつ高生産させるには、融合蛋白の等電点が4.9から6.9の間の酸性領域に収まることが重要であることが本発明者等により初めて明らかにされた。また、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、蛋白の染色を行い、菌体あたりの融合蛋白の生産量をゲルスキャナーで定量した結果を表1に菌体当たりの封入体量 (相対値)として示す。

【0072】菌体あたりの融合蛋白量はW3110/pG97S4DhCT [G] R4株を100とした時に、

各々の菌株は96-116の封入体を生産していた。培養液あたりの総封入体量はW3110/pG97S4DhCT [G] R10株では6148, W3110/pG97S4DhCT [G] R8株では13560と菌株により約2倍の違いが見られた。培養液あたりの総封入体量ではW3110/pG97S4DhCT [G] R8株がもっとも高かったが、hCTの製造にはキメラ蛋白質からのV8プロテアーゼによる切断反応があり、キメラ蛋白質からのV8プロテアーゼによる切断反応効率が製造工程の収量に大きく関わってくる。

【0073】そこで得られた封入体をもちいてV8プロテアーゼによる切断反応の効率を検討した。前述の30リッター培養槽による培養後、培養液1000mlを採取し高圧ホモジナイザー (Manton Gaulin Laboratory Homogenizer 15M-8TA)を用いて、600Kg/cm²で菌体の破碎処理を行い7000rpm, 30分間の遠心分離により封入体を含む沈殿を回収した。その後、最初の容量に等しくなるように沈殿画分に脱イオン水を加え、懸濁液を再び遠心を行うことで沈殿の洗浄を行った。

【0074】この洗浄操作をさらにもう一度繰り返し最終的に得られた沈殿をOD600値が800となるように脱イオン水で懸濁後、以下に示すV8プロテアーゼによる切断反応に使用した。0.6mlの懸濁液を採取し、この懸濁液に1MTrisHCl (pH8.0) 75μl、尿素540mg, 100mMDTT185μlを加え、10分間放置後、最終容量が3.7mlになるように脱イオン水を加え、30℃で10分間予熱した後、V8プロテアーゼ (1mg/ml)を7μl加え、1時間反応を行った。

【0075】切断されたhCT [G]はYMCpackedカラムA-302 (0.46cm×15cm、山村化学研究所)を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC)により定量を行った。溶出は0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA)と0.1%TFA/50%アセトニトリルを用いた直線濃度勾配で行った。その結果、hCT [G]の融合蛋白からの切断の効率はhCT [G]融合蛋白により大きく異なることが明らかになった。

【0076】一番切断の効率が良いのはW3110/pG97S4DhCT [G] R4株の97%であり、一番切断の効率が悪いのはW3110/pG97S4DhCT [G] R5株の7%である。この切断の効率は最終菌体濃度とは何ら相関がない。また、融合蛋白に挿入されたリンカーペプチドの塩基性のアミノ酸残基の数にも相関性は見られなく、むしろ、V8プロテアーゼの切断認識部位領域のアミノ酸配列に影響されているものと考えられる。いずれにせよW3110/pG97S4DhCT [G] R4株が回収hCT [G]がもっとも高く、この菌株をもちいてヒトカルシトニン前駆体からアミド化酵素によるヒトカルシトニンへの変換を行った。

【0077】実施例4. hCT [G] 前駆体の精製とア

ミド化酵素によるヒトカルシトニンへの変換

W3110/pG97S4DhCT [G] R4菌株を用いて20リッター培養槽で前述のごとく培養後、前述の方法に従い融合蛋白の封入体の懸濁液を得た。この封入体の懸濁液6mlを採取し、1MTris-HCl (pH8.0) 750μl, 0.5MEDTA (pH8.0) 75μl、尿素5.4g及びDTT17mgを加え、10分放置後、脱イオン水を最終容量37mlになるように加え、次に、V8プロテアーゼ (1mg/ml)を40μl添加し、37℃で90分間処理をした。

【0078】その後反応液を脱イオン水で2倍に希釈し、30分放置後酢酸を加えpHを4.6にした。pHを4.6にすることにより保護ペプチドのβ-gal97S4Dは沈殿し、上清画分にhCT [G]は残り、15分の遠心操作により上清画分を分離し、この上清画分を10mM酢酸アンモニウム (pH4.6)で平衡化したSPセファロース (Tosoh) カラムにアプライシカラムクロマトグラフを行う。hCT [G]は40mM酢酸アンモニウム (pH6.5)で段階的に溶出した。培養液1リッターあたり約0.8gのhCT [G]が得られた。

【0079】このようにして得られたhCT [G]を特開平2-190193に記載の方法に従ってアミド化酵素を反応させることで効率よくヒトカルシトニンを製造することができた。アミド化反応後、YMCpackedカラムA-302 (山村化学研究所)を用いて高速液体クロマトグラフィーを行った結果を図8に示す。ヒトカルシトニンはこの溶出条件では保持時間9.7分に溶出され、この図から明らかなように非常に高収率で純度の高いヒトカルシトニンが得られることがわかる。

【0080】実施例5. ヒトCNP-22遺伝子の調製
V8プロテアーゼの切断部位であるグルタミン酸残基をN末端に付加したヒトCNP-22をコードする遺伝子を、試験管内DNA増幅法 (PCR法)により以下のように調製した。鋳型DNAとしてpUCCNP1プラスミドを用いた。K緩衝液 (20mMTris/HCl pH8.5, 100mMKCl, 1mMジスレイトール; 以下DTT) 157μl中で、pUCCNP1 1.57μgに12ユニットのEcoRIを37℃、60分間反応させ、切断した。反応液を常法に従い、フェノール処理、2-ブタノール処理、エタノール沈殿を行ない、切断したDNA断片をTE緩衝液 (10mMTris/HCl pH8.0, 1mMEDTA) 157μlに溶解した。

【0081】PCR反応に用いるプライマーのデザインを図9に示す。プライマー1 [配列番号11]はヒトCNP-22のN末端にV8プロテアーゼが切断するグルタミン酸残基を付加し、さらにその上流にEcoRIおよびXhoI制限酵素切断部位を持たせるように、プライマー2 [配列番号12]はヒトCNP-22遺伝子の直後にSalI制限酵素切断部位を持たせるようにデザインした。これらのプライマーはDNA合成機 (アプライ

ドバイオシステム社製 380A型)を用い合成した。合成後、8M尿素を含む20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、プライマーに対応する長さのDNA断片をゲルからきりだし、各々のプライマーを作製した。

【0082】前述のEcoRIで切断したpUCCNP1 10ngとプライマー(各々1pmol)を含む反応液(10mM Tris HCl pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1%ゼラチン、各々200μMのdGTP, dATP, dTTPおよびdCTP)100μlを95℃、5分間放置した後、水中で急冷した。その後、0.5ユニットのTaq DNAポリメラーゼ(Ampli-Taq 宝酒造)を添加し、さらにミネラルオイルを加えた後、サーマルリアクター(HYBAID社)を使用しPCR反応を行なった。

【0083】反応は熱変性(92℃、1分間)、アニーリング(55℃、2分間)、およびDNA伸張反応(72℃、3分間)の連続反応を1サイクルとして30サイクル繰り返した。最終サイクルのDNA伸張反応は更に7分間延長した。反応後、TE緩衝液を加え、400μlにメスアップした後、全量をSUPREC-02(宝酒造)に入れ、2,000gで8分間遠心した。濾過液を除き、さらにTE緩衝液を入れ約400μlに液量を増やした後、同様の遠心操作を行なった。フィルター付きカップ中に残るPCR反応液をTE緩衝液で40μlにした。

【0084】このPCR反応液40μlに10倍濃度のHigh緩衝液(100mM Tris HCl pH7.5, 1M NaCl, 100mM MgCl₂, 10mM DTT)5μlおよびEcoRI 36ユニット、SalI 60ユニットを加え、水で全量を50μlにした後、37℃、60分間反応を行なった。反応後、フェノール処理、2-ブタノール処理、エタノール沈殿を行ない、最終的にTE緩衝液に溶解し、遺伝子の両端にEcoRIおよびSalI cohesive endをもつヒトCNP-22遺伝子を調製した。

【0085】実施例6-(a) 発現プラスミドpG97S4DhCNP-22の作製

図10に示したヒトCNP-22遺伝子のPCR産物を、βgal97S4D(β-ガラクトシダーゼのN末端の97個のアミノ酸からなり、その中でシステイン残基がセリン残基に置き換えられ、さらに4個のグルタミン残基がアスパラギン酸残基に置き換えられているペプチド)遺伝子を含有するプラスミドpG97S4DhCT[GRRR]に、EcoRIおよびSalI制限酵素切断部位を介して挿入し、プラスミドpG97S4DhCNP-22の作製を行なった。その作製方法を以下に記す。

【0086】まず、pG97S4DhCT[GRRR]10μgをHigh緩衝液70μlで36ユニットのE

coRIおよび60ユニットのSalIを用いて、37℃、60分間切断反応を行なった。反応後、常法に従い、1.0%寒天ゲル電気泳動を行ない目的とする3.1kbのEcoRI-SalI断片を含むゲルを切り出した。寒天ゲル内のDNA断片をマイクロ遠心チューブSUPREC-01(宝酒造)を用いて抽出した後、フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿をおこない精製した。

【0087】次に、このEcoRI-SalI DNA断片とPCR産物のヒトCNP-22遺伝子断片(EcoRI-SalI DNA断片)を各々5μlを混合し、DNAライゲーションキット(宝酒造)を用いて、ライゲーション反応を行なった。反応後、常法に従い、大腸菌W3110株に形質転換を行ない、テトラサイクリン耐性形質転換株W3110/pG97S4DhCNP-22を得た。

【0088】実施例6-(b) 発現プラスミドpG97S4DhCNP-22R3-2およびpG97S4DhCNP-22R5-2の作製

図11に示すR3-2およびR5-2のアミノ酸配列をコードするリンカーペプチド遺伝子をβgal97S4D遺伝子とヒトCNP-22遺伝子との結合部に挿入するため以下の操作を行なった。pG97S4DhCNP-22R3-2およびpG97S4DhCNP-22R5-2の作製を図12に示す。

【0089】pG97S4DhCNP-22の3μgを50μlのHigh緩衝液中で、EcoRIおよびXhoIを各々10ユニット加え、37℃、2時間反応を行なった。反応後、1%寒天ゲル電気泳動を行ない、2.7kbのDNA断片をゲルから電気泳動法により回収した。このDNA断片と化学合成したR3-2およびR5-2配列をコードするオリゴヌクレオチド20pmolをライゲーションキット(宝酒造)をもちいて、ライゲーション反応を行ない、その後、常法に従い大腸菌W3110に形質転換を行なった。テトラサイクリン耐性形質転換株よりプラスミドを単離し、プラスミドの構造解析を制限酵素を用いて行ない、目的とするW3110/pG97S4DhCNP-22R3-2およびpG97S4DhCNP-22R5-2を得た。

【0090】実施例6-(c) pG97S4DhCNP-22R5-3の作製

図11に示したR5-3のアミノ酸配列をコードするリンカーペプチド遺伝子をβgal97S4D遺伝子とヒトCNP-22遺伝子との結合部に挿入するため以下の操作を行なった。pG97S4DhCNP-22R5-3の作製方法を図13に示す。

【0091】pG97S4DhCNP-22 3μgをHigh緩衝液50μl中でEcoRIを10ユニット加え、37℃、2時間反応を行なった後、0.5ユニットのアルカリホスファターゼを加え、5'末端の脱リン酸

化反応を37℃、1時間行なった。反応終了後、フェノール処理を行なった後、1%寒天ゲル電気泳動を行ない、2.7kbのDNA断片をゲルより電気泳動法により回収した。次に、化学合成したR5-3のアミノ酸配列をコードするオリゴヌクレオチド3μgを100μlのT4ポリヌクレオチドキナーゼ反応液(0.5M Tris HCl pH8.0, 0.1mM MgCl₂, 0.1M 2-mercaptoethanol, 1mM ATP)中でT4ヌクレオチドキナーゼを20ユニットを加え、37℃、1時間リン酸化反応を行なった。

【0092】このリン酸化したオリゴヌクレオチド2μlと前述したEcoRI切断、アルカリホスファターゼ処理したpG97S4DhCNP-22とライゲーション反応を行なった。その後、反応液を常法に従い、大腸菌W3110に形質転換を行ない、テトラサイクリン耐性形質転換株を得た。得られた形質転換株よりプラスミドを単離し、制限酵素による解析を行ない、目的の形質転換株W3110/pG97S4DhCNP-22R5-3を得た。

【0093】実施例7. ヒトCNP-22融合蛋白の生産

作製した菌株の融合蛋白の等電点と生産性の関係を検討するため、菌株を培養し、細胞数あたりの融合蛋白の生産性をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて調べた。作製した菌株を500mlのNu1培地(酵母エキス0.4g/L、リン酸二カリウム4g/L、リン酸一カリウム4g/L、リン酸二ナトリウム2.7g/L、硫酸アンモニウム1.2g/L、塩化アンモニウム0.2g/L、0.8%グリセリン、硫酸マグネシウム2g/Lおよびテトラサイクリン10mg/L)で37℃、12時間、フラスコで培養を行った。

【0094】培養後、培養液の濁度(OD₆₀₀)を分光光度計で測定し、[OD₆₀₀値×培養容量(ml)]の値が5になるように培養液を採取し、12000rpm、5分間遠心を行い、菌体を分離した。この菌体沈殿物に1mlのSDSサンプルバッファー(63mM Tris-HCl pH6.8, 10%グリセリン、10%SDS、5%2-メルカプトエタノール、12.5mg/Lブロムフェノールブルー)を加え、95℃5分間加熱し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の試料とした。

【0095】上記試料の5mlを用いてSDS-15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(TEFCO製)を18mA、90分間の条件で行った。泳動後、ゲルを染色液(10%酢酸、40%メタノール、2g/LクマジーブリリアントブルーR250)で染色し、各菌株の生産したヒトCNP-22融合蛋白の細胞あたりの生産性を比較した。電気泳動の結果を図14に示す。

【0096】図14に示すようにW3110/pG967S4DhCNP-22:融合蛋白等電点=4.56の菌株を他の菌株(W3110/pG967S4DhCNP

P-22R3-2:融合蛋白等電点=4.95、W3110/pG967S4DhCNP-22R5-2:融合蛋白等電点=6.22、W3110/pG967S4DhCNP-22R5-3:融合蛋白等電点=5.59)を比較すると、W3110/pG967S4DhCNP-22R3-2、W3110/pG967S4DhCNP-22R5-2およびW3110/pG967S4DhCNP-22R5-3菌株はW3110/pG967S4DhCNP-22より融合蛋白の生産性が向上していることが明らかになった。

【0097】特にW3110/pG967S4DhCNP-22R5-2およびW3110/pG967S4DhCNP-22R5-3菌株は融合蛋白を高発現していることが示された。従って、融合蛋白の等電点を4.9から6.9の領域に入れることで融合蛋白の生産性が増加することがこの実施例においても実証された。

【0098】実施例8. V8プロテアーゼによる融合蛋白からヒトCNP-22の切り出し。

融合蛋白からヒトCNP-22をV8プロテアーゼを用いた切り出しの効率を検討するため以下の実験を行なった。W3110/pG967S4DhCNP-22R3-2、W3110/pG967S4DhCNP-22R5-2およびW3110/pG967S4DhCNP-22R5-3の菌株を前述のNu1培地で培養後、培養液400mlを採取し、高圧ホモジナイザー(Manton Gaulin Laboratory Homogenizer 15M-8TA)を用いて600kg/cm²で菌体の破碎処理を行なった。

【0099】その後、7000rpm、30分間の遠心分離を行ない、封入体を含む沈殿を回収した。得られた沈殿画分に400mlの緩衝液A(50mM Tris HCl pH8.0, 2mM EDTA, 1%Triton X-100)を添加し、懸濁後再び遠心することにより沈殿の洗浄を行なった。この沈殿操作を緩衝液Aを用いて2回、脱イオン水を用いて1回行なった。最終的に得られた沈殿をOD660の値が2.0となるように脱イオン水で懸濁後、以下に示す方法でV8プロテアーゼによる融合蛋白の切断反応を行なった。

【0100】60μlの封入体懸濁液に1M Tris HCl pH8.0を6μl、0.5mM EDTAを0.6μl、尿素36mgおよび1MDTTを3μl加えて懸濁し、10分間放置した。放置後、最終容量が300μlになるように脱イオン水を加え、V8プロテアーゼ(1mg/ml)を1μl加え30℃、1時間切断反応を行なった。融合蛋白から切断されたヒトCNP-22定量をYMC PackedカラムA-302(2.46cm×15cm山村化学研究所)を用い高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により行なった。

【0101】V8切断反応液を2M尿素、6%酢酸溶液で20倍希釈し、その20μlをもちいHPLC分析を行なった。HPLCの溶出は0.1%トリフルオロ酢酸

(TFA)と0.1%TFA、50%アセトニトリルを用いた直線濃度勾配で行なった。β-gal 1967S4D hCNP-22R5-3融合蛋白のV8プロテアーゼ切断前、および切断後のHPLCの溶出パターンをそれぞれ図15および図16に示す。図15および図16から明らかなようにV8プロテアーゼの切断により、融合蛋白からヒトCNP-22標準品と一致するピークが出現し、融合蛋白からヒトCNP-22が特異的に切り出されることが示された。

【0102】ヒトCNP-22の切断は他のβ-gal 1967S4D hCNP-22R5-2およびβ-gal 1967S4D hCNP-22R3-2に於ても効率良く行なわれ、ヒトCNP-22標準品と一致するピークを同定した。上記の条件で切り出されたヒトCNP-22の量と切断効率はpG97S4DhCNP22R3-2；効率99%、pG97S4DhCNP22R5-2；効率95%およびpG97S4DhCNP22R5-3；効率92%であった。

【0103】以上示した結果より、ヒトCNP-22を生産するにあたり融合蛋白の等電点を4.9から6.9に調節するようにリンカーペプチド領域のアミノ酸の電荷を変えることでヒトCNP-22の高生産が行なえること、さらにこのようにして高生産された融合蛋白からV8プロテアーゼを用いることでヒトCNP-22が特異的に切り出されることが、本発明者が先に報告したヒトカルシトニンの例のみならず、この実施例においても *

配列

CGG CAT CAC CGG CGC CAC AGG TGC GGT TGC TGG CGC CTA TAT CGC	45
Arg His His Arg Arg His Arg Cys Gly Cys Trp Arg Leu Tys Arg	
5 10 15	
CGA CAT CAC CGA TGG GGA AGA TCG GGC TCG CCA CTT CGG GCT CAT	90
Arg His His Arg Trp Gly Arg Ser Gly Ser Pro Leu Arg Ala His	
20 25 30	
GAG CAA TTC	99
Glu Gln Phe	

【0107】配列番号：2

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列

AATTCTCGGG CTCGCCACTT CGGGCTCATC 30

【0108】配列番号：3

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列

TCGAGATGAG CCCGAAGTGG CGAGCCCGAG 30

【0109】配列番号：4

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

AATTCGCGCT ATATCGCCGA C 21

* 明らかになった。

【0104】

【発明の効果】本発明では目的ペプチドを融合蛋白として生産させるにあたり、融合蛋白の等電点を酸性側になるように融合蛋白をデザインし、菌体内で封入体として融合蛋白を高生産することが本発明者等により初めて明らかにされ、目的ペプチドを有する融合蛋白を高生産することが可能になった。

【0105】従って、本発明における宿主細胞を用いた大量培養により、目的ペプチドを有する融合蛋白の高い生産性が得られ、工業スケールでの生理活性ペプチドの生産に十分使用することが可能である。また、本発明で得られた宿主細胞を用いて大量培養後、融合蛋白よりヒトカルシトニン前駆体を分離精製し、アミド化酵素を用いてヒトカルシトニン前駆体よりC-末端がアミド化されたヒトカルシトニンやヒトCNP-22を高収率かつ高純度で製造する方法を確立することができた。

【0106】

【配列表】

20 配列番号：1
配列の長さ：99
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：
起源：プラスミド pBR322

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

25

26

【0110】配列番号：5

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

TCGAGTCGGC GATATAGCG G

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

21

【0111】配列番号：6

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

AATTCCGGCA TCACCGCGC CACAGGC

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

27

【0112】配列番号：7

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

TCGAGCCTGT GCGCCGGTG ATGCCGG

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

27

【0113】配列番号：8

配列の長さ：39

配列の型：核酸

配列

AATTCCGCCT ATATCGCOGA CATCACGAT GGGGAAGAC

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

39

【0114】配列番号：9

配列の長さ：39

配列の型：核酸

配列

TCGAGTCTTC CCCATCGGTG ATGTCGGCGA TATAGCGG

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：合成DNA

39

【0115】配列番号：10

配列の長さ：69

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：

起源：プラスミド pUCCNP1

配列

GGC TTG TCC AAG GGC TGC TTC GGC CTC AAG CTG GAC CGA ATC GGC 45

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

5

10

15

TCC ATG AGC GGC GTG GGA TGT TAG 69

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

【0116】配列番号：11

配列の長さ：31

配列の型：核酸

配列

TAAGAATTCC TCGAGGGCTT GTCCAAGGC T

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

31

【0117】配列番号：12

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列

TAAGTCGACT TAACATCCCA GGCCGCGCT

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

30

【0118】配列番号：13

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

50

27

AATTCCGGCG CCGAGAGTTC C

【0119】配列番号：14

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

TCGAGGAACT CTCGGCGCCG G

【0120】配列番号：15

配列の長さ：36

配列の型：核酸

配列

AATTCCGGCG CCATCACCGG CGCCACCGAG AGTTCC

【0121】配列番号：16

配列の長さ：36

配列の型：核酸

配列

TCGAGGAACT CTCGGTGGCG CCGGTGATGG CGCCGG

【0122】配列番号：17

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

AATTTCGACG CCGTCGCCGA G

【0123】配列番号：18

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

AATTCTCGGC GACGGCGTCG A

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はプラスミドpBR322中のヌクレオチド位置403～495耐性遺伝子の一部分のヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列、並びに各リンカーペプチドをコードする部分を示し、この配列を配列番号1に示す。

【図2】図2はプラスミドpG97S4DhCT〔G〕R10及びpG97S4DhCT〔G〕R6の作製過程を示す。

【図3】図3はプラスミドpG97S4DhCT〔G〕R8の作製過程を示す。

【図4】図4はプラスミドpG97S4DhCT〔G〕R1～R5の作製過程を示す。

【図5】図5はリンカー部分をコードするDNAであるR1～R5のヌクレオチド配列を示し、これらの配列はさらに配列番号：2～9にも示す。

【図6】図6は各リンカーペプチドのアミノ酸配列を示す。

【図7】図7は、各発現プラスミドからの融合蛋白の発現の状態を示す電気泳動図であり、図面に代る写真である。

【図8】図8は、本発明の方法により得られたヒトカル

28

21

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

21

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

36

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

36

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

21

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：合成DNA

21

シトニンの高速液体クロマトグラフィーの結果を示す。

【図9】図9は、CNP-22のアミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列並びにその両端に制限酵素部位を挿入するためのPCRプライマーを示す。

【図10】図10は、プラスミドpG97S4DhCNP-22の作製過程を示す。

【図11】図11は、融合蛋白質の等電点を調節するためのリンカーペプチドおよびそれをコードするオリゴヌクレオチドの配列を示す。

【図12】図12は、プラスミドpG97S4DhCNP-22R3-2、及びpG97S4DhCNP-22R5-2の作製過程を示す。

【図13】図13は、プラスミドpG97S4DhCNP-22R5-3の作製過程を示す。

【図14】図14は、等電点を調節した融合蛋白質の発現量を比較した結果を示す電気泳動図である。

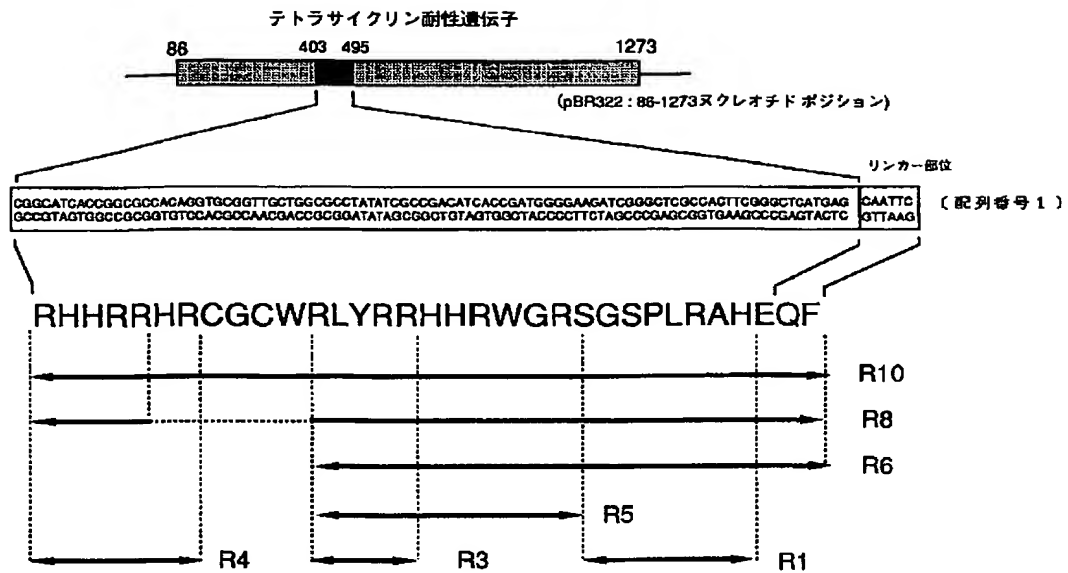
【図15】図15は、hCNP-22を切り出す前の融合蛋白質の高速液体クロマトグラフィーにおける溶出を示す。

【図16】図16は、融合蛋白質からhCNP-22を切り出した後の高速液体クロマトグラフィーにおける溶出を示す。

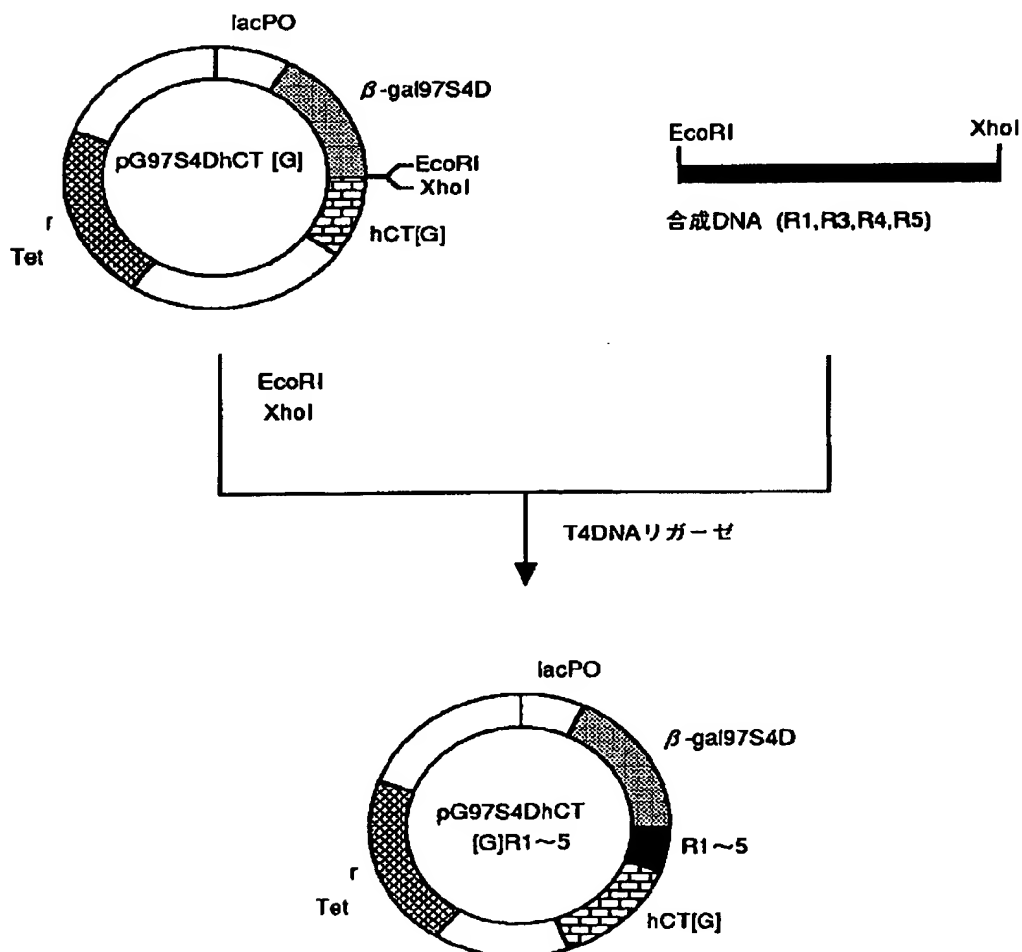
30

40

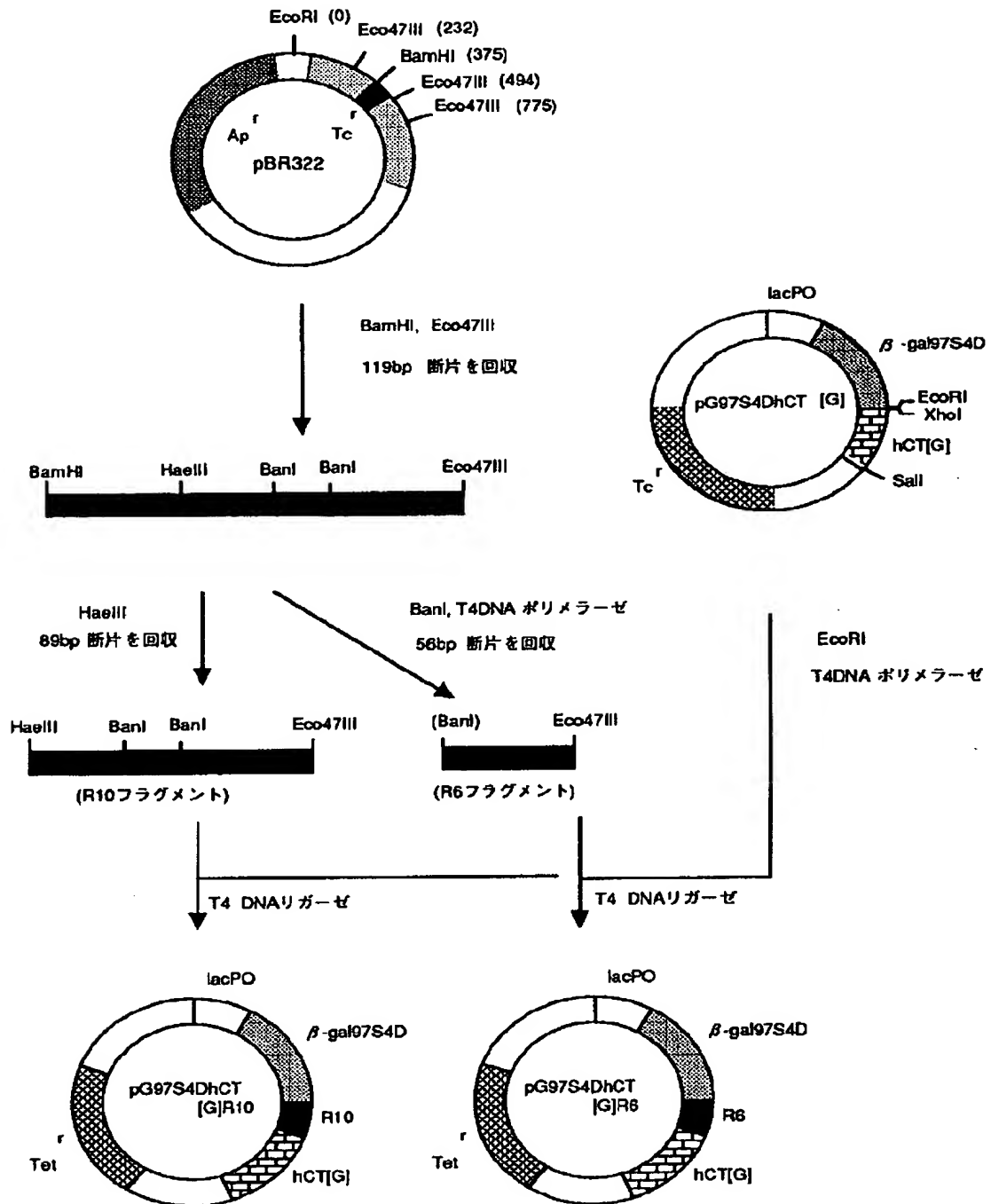
【図1】



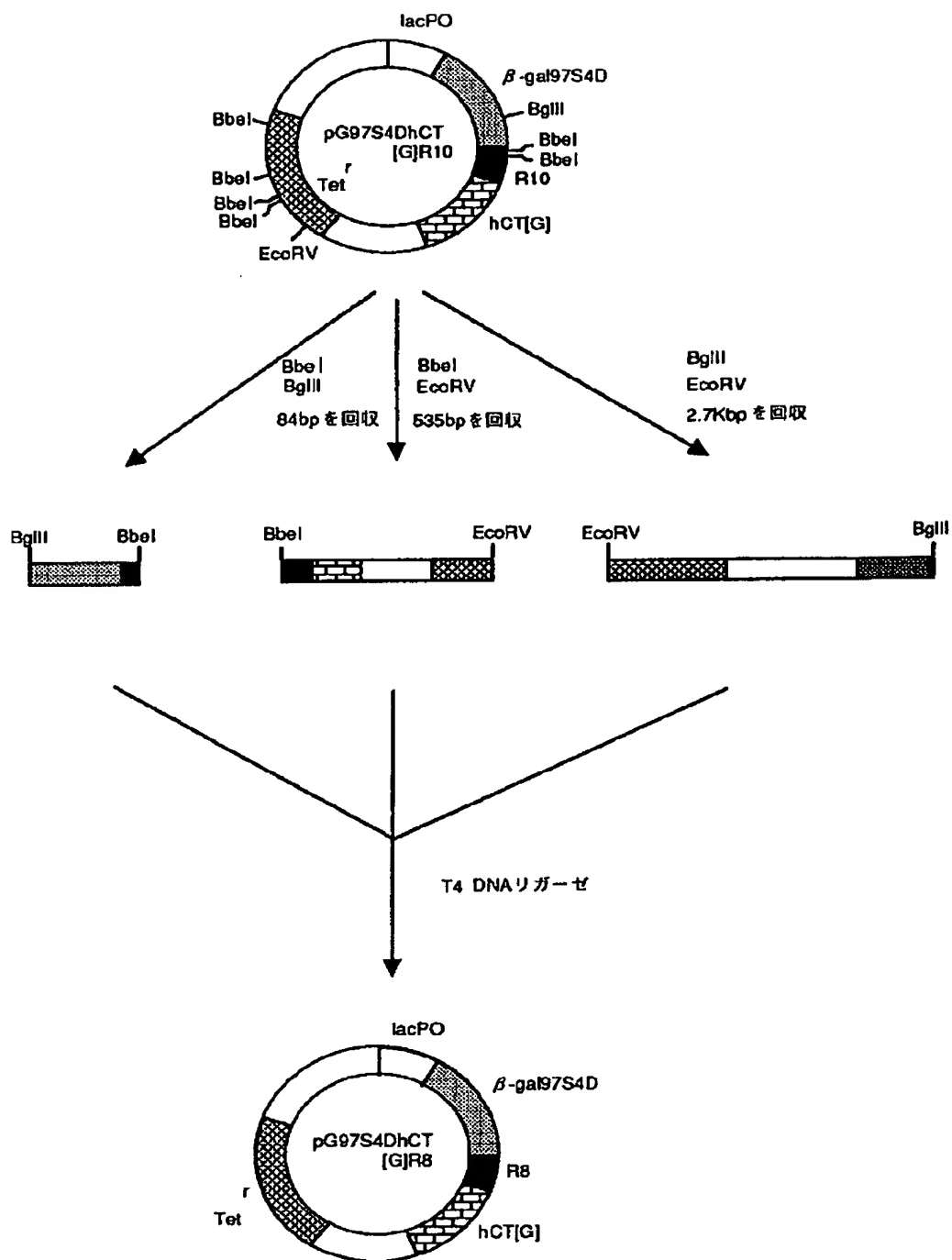
【図4】



【図2】



【図3】



【図5】

R1: 5'-AATTCTCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATC-3'
3'-GAGCCCGAGCGGTGAAGCCCGAGTAGAGCT-5'

(配列番号:2)

(配列番号:3)

R3: 5'-AATTCCGCCTATATCGCCGAC-3'
3'-GGCGGATATAGCGGGTGAGCT-5'

(配列番号:4)

(配列番号:5)

R4: 5'-AATTCCGGCATCACCGGCGCCACAGGC-3'
3'-GGCCGTAGTGGCCGCGGTGTCCGAGCT-5'

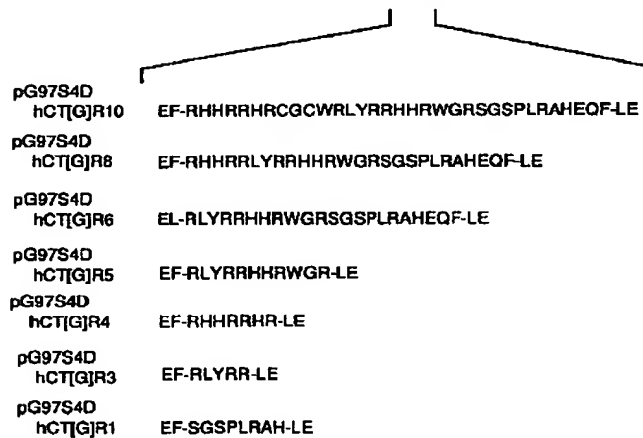
(配列番号:6)

(配列番号:7)

R5: 5'-AATTCCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGAC-3' (配列番号:8)
3'-GGCGGATATAGCGGCTGTAGTGGCTACCCCTTCTGAGCT-5' (配列番号:9)

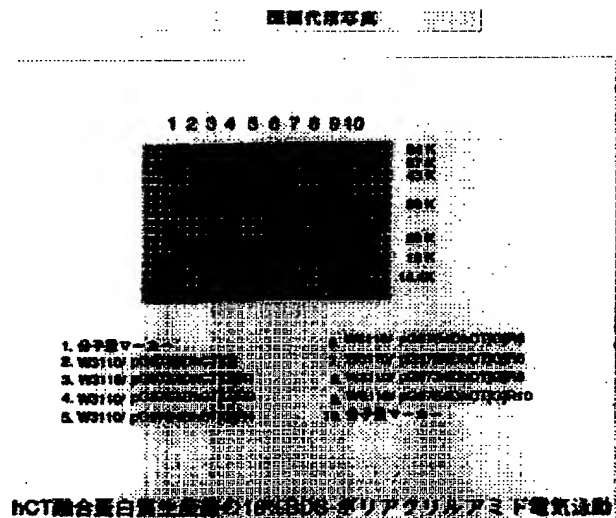
【図6】

pG97S4DhCT[G] : β -gal97S4D-EF-LE-hCT[G]
EcoRI XhoI

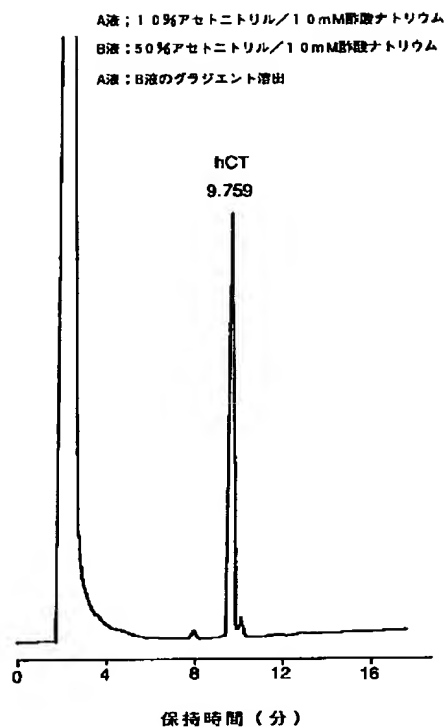


R: アルギニン残基

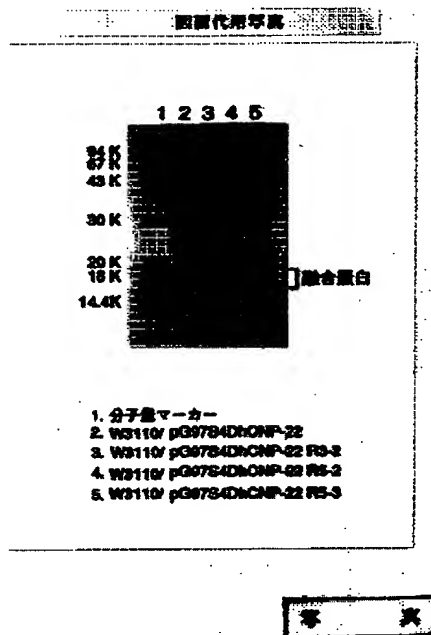
【図7】



【図8】

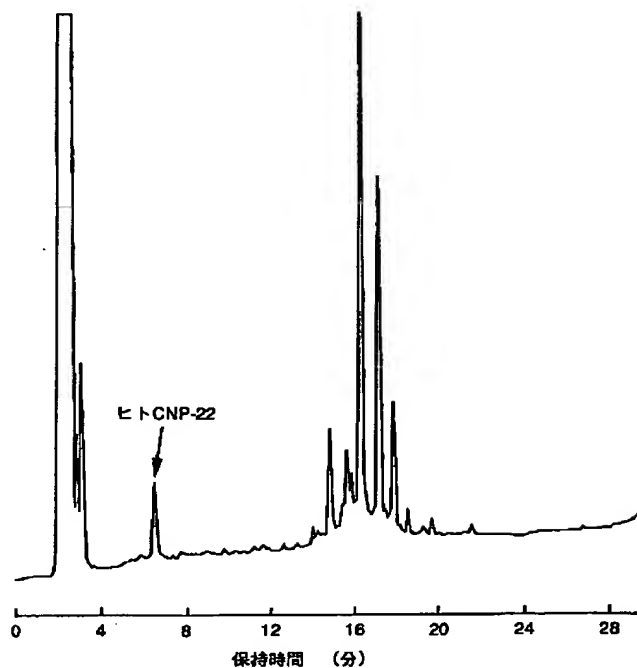
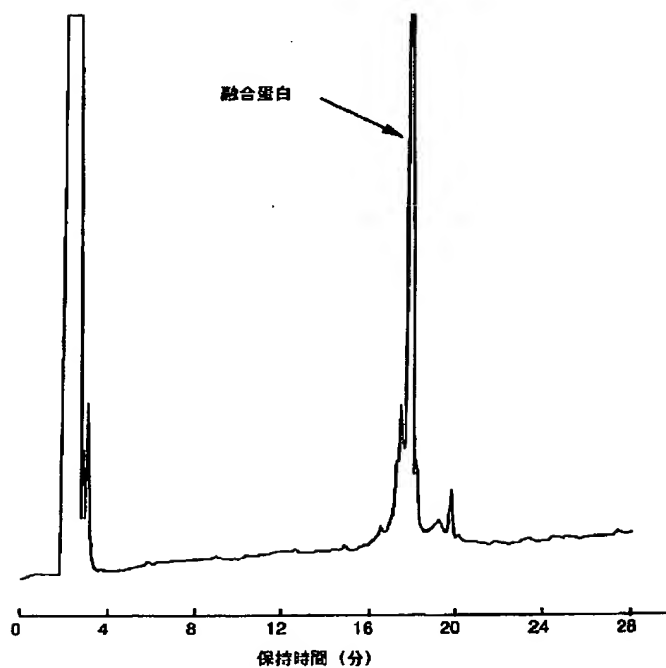


【図14】



【図16】

【図15】



(a) CNP-22アミノ酸配列およびDNA配列

GlyLeuSerLysGlyCysPheGlyLeuLysLeuAspArgIleGlySerMetSerGlyLeuGlyCys *

[配列番号 10]

GGCTTGTTCCAAAGGGCTGCTTCGGCCTCAAGCTGGACCGAATCGGCTCCATGAGCGGCTGGGATGTTAG
CCGAACAGGTTCCCGACGAAGCGGAGTTCGACCTGGCTTAGCCGAGGTACTCGCCGGACCCCTACATC

(b) プライマーのデザイン

プライマー-1

EcoRI XhoI

5'-TAAGAAATTCCTCGAGGGCTTGTTCCAAAGGGCT-3'

[配列番号 11]

プライマー-2

3'-TCGCGCGCGGACCCCTACAATTCAGCTGAAT-5'

[配列番号 12]

Sall

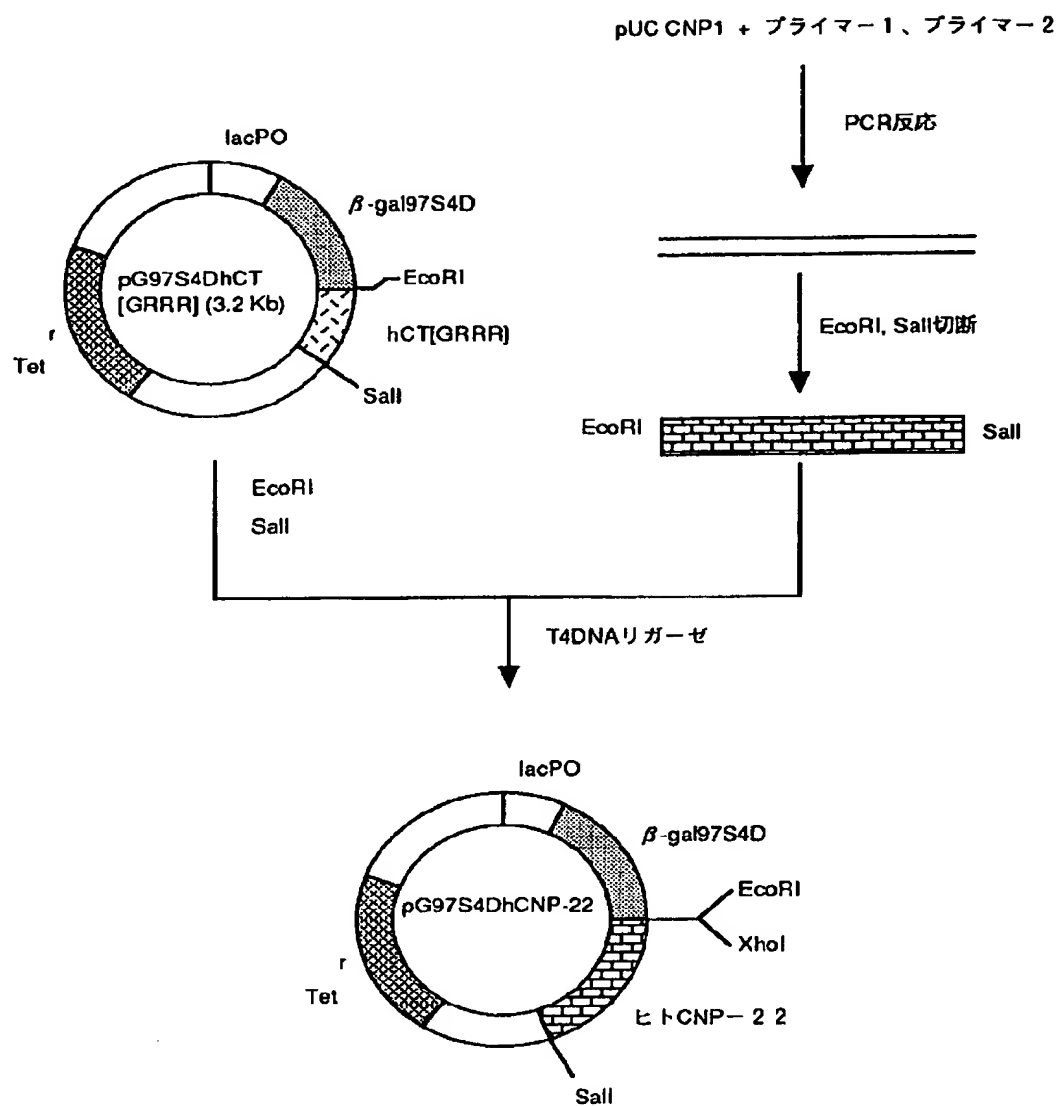
【図9】

(21)

特開平5-328992

下線はプライマーとCNP遺伝子的一致するDNA塩基配列を示す。
新しく遺伝子に導入する制限酵素部位を囲む。

【図10】



R 3 - 2

GluPheArgArgGluPheLeuGlu
AATTCGGGCGCAGATTCC
GGCCGGGCTCTCAAGGAGCT

(配列番号 1 3)
(配列番号 1 4)

R 5 - 2

GluPheArgArgHisArgArgHisArgGluPheLeuGlu
AATTCGGGCGCCATCACCGGCCACCGAGAGTTCC
GGCCGGGTAGTGGCCGGGTGGCTCTCAAGGAGCT

(配列番号 1 5)
(配列番号 1 6)

R 5 - 3

GluPheArgArgArgArgGluPhe
AATTTCGACGCCGTCGCCGAG
AGCTGGGCAGCGGCTCTTAA

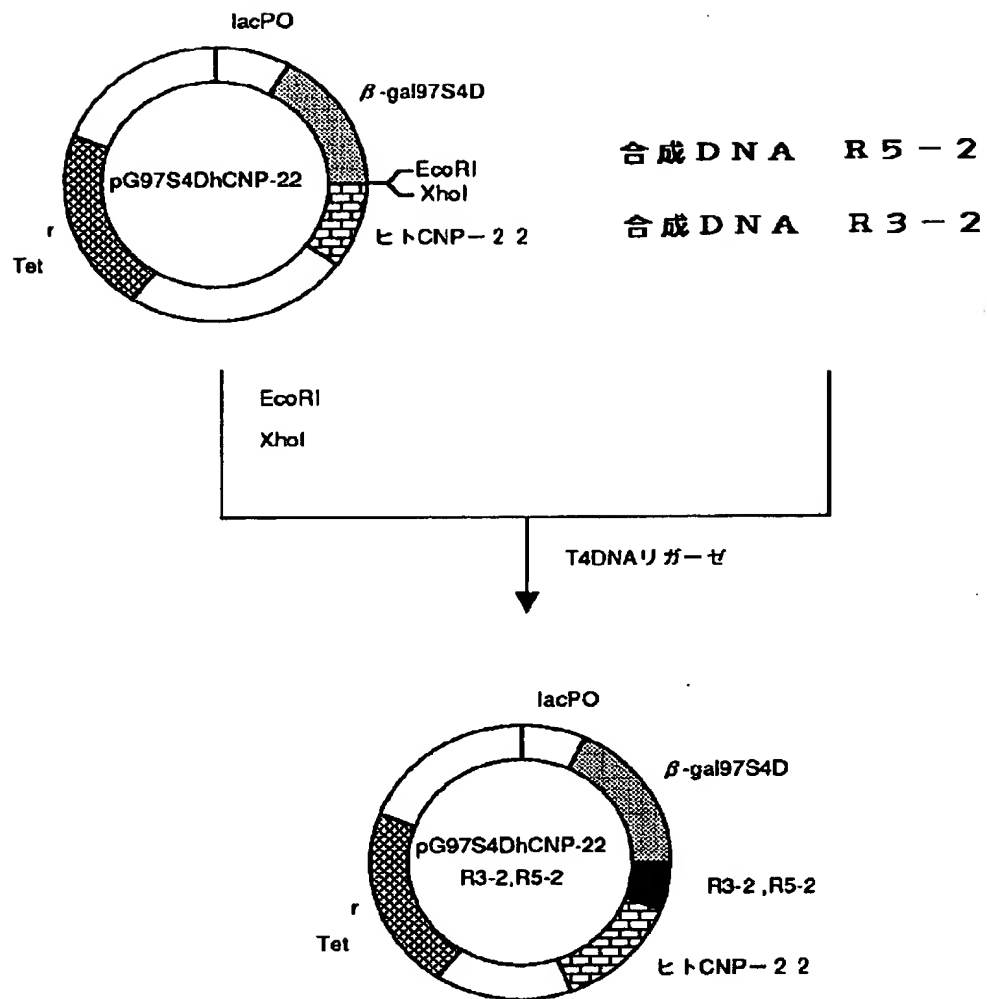
(配列番号 1 7)
(配列番号 1 8)

(23)

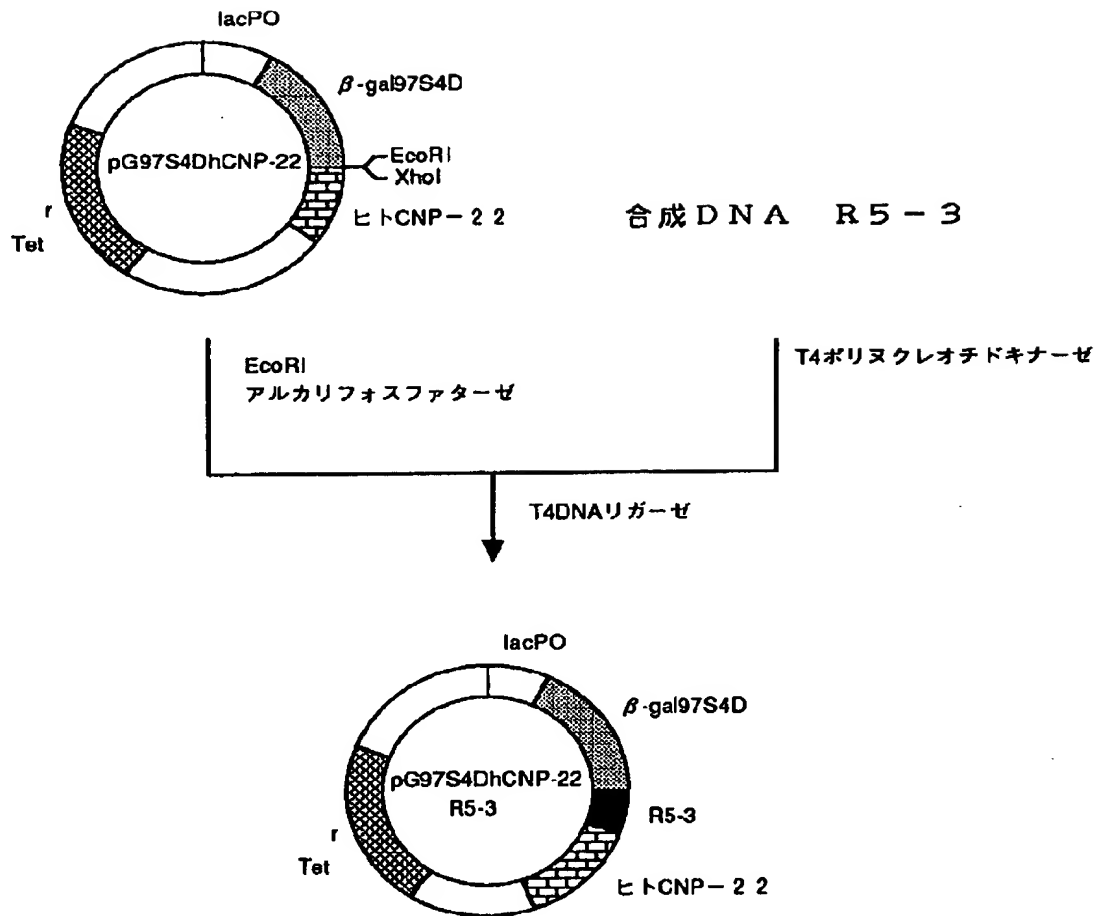
【 図 1 1 】

特開平 5 - 3 2 8 9 9 2

【図12】



【図 13】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/67				
15/70				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				
(72)発明者 大末 和廣			(72)発明者 小内 誠子	
群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ			群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ	
2716番地1 サントリー株式会社医薬セン			2716番地1 サントリー株式会社医薬セン	
ター内			ター内	
(72)発明者 大島 武博			(72)発明者 孫田 浩二	
群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ			大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号	
2716番地1 サントリー株式会社医薬セン			サントリー株式会社生物医学研究所内	
ター内			(72)発明者 田中 正治	
			大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号	
			サントリー株式会社生物医学研究所内	